

Protease inhibitor for treating contact dermatitis, psoriasis, permphigus vulgaris and congenital varicella, contains extract of plant of Lathariella and/or Cladonia as active ingredient

Patent Number : JP2001354582

International patents classification : A61K-035/82 A61K-007/00 A61K-007/48 A61P-017/00 A61P-017/16 A61P-043/00

• Abstract :

JP2001354582 A NOVELTY - A protease inhibitor contains extract of plant, such as Lathariella and/or Cladonia as active ingredient.

DETAILED DESCRIPTION - INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following:

- (i) a serine protease inhibitor containing extract of plant, such as Lathariella and/or Cladonia as active ingredient;
- (ii) a plasmin inhibitor containing extract of plant, such as Lathariella and/or Cladonia as active ingredient;
- (iii) a matrix metalloprotease (MMPs) inhibitor containing extract of plant, such as Lathariella and/or Cladonia as active ingredient;
- (iv) a collagenase inhibitor containing extract of plant, such as Lathariella and/or Cladonia as active ingredient; and
- (v) a gelatinase inhibitor containing extract of plant, such as Lathariella and/or Cladonia as active ingredient.

ACTIVITY - Dermatological; antipsoriatic.

No test details are given in the source material.

MECHANISM OF ACTION - Protease inhibitor; serine protease inhibitor; plasmin inhibitor; matrix metalloprotease (MMPs) inhibitor; collagenase inhibitor; gelatinase inhibitor (claimed).

Lethariella cladonioides (50 g) was immersed in ethanol for 1 week at room temperature. The extract was then concentration-dried and dissolved in dimethyl sulfoxide. The plasmin inhibitory effect of the extract was then analyzed by fibrin flat plate method at 37 deg. C for 18 hours. The change of fibrinogen to fibrin was observed. The result showed the extract was found to have excellent plasmin inhibition rate.

USE - For treating contact dermatitis, psoriasis, permphigus vulgaris and congenital varicella.

ADVANTAGE - The protease inhibitor effectively improves rough/dry skin induced by dermatological disorders and improves skin aging. (Dwg.0/0)

• Publication data :

Patent Family : JP2001354582 A 20011225 DW2002-31 A61K-035/82 10p * AP: 2000JP-0181179 20000616

Priority n° : 2000JP-0181179 20000616

Covered countries : 1

Publications count : 1

• Patentee & Inventor(s) :

Patent assignee : (MDNI-) MD JAPAN KK

• Accession codes :

Accession N° : 2002-262908 [31]

Sec. Acc. n° CPI : C2002-078300

• Derwent codes :

Manual code : CPI: B04-A08C2 B04-A10 B14-D07C B14-N17C D08-B09A D08-B09A1

Derwent Classes : B04 D21

Compound Numbers : RA00GT-K RA00GT-T RA00GT-U

• Update codes :

Basic update code :2002-31

Others :

Technology Abstract

TECHNOLOGY FOCUS

BIOLOGY - Preferred Extract: The extract is obtained from plant of Lathariella, Lathariella cladonioides and/or Cladonia, Cladonia fallax.

Keyword Index Terms [1] 200757-0-0-0-CL; 200757-0-0-0-USE

UP4 2002-05

This Page Blank (uspic)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-354582

(P2001-354582A)

(43) 公開日 平成13年12月25日 (2001. 12. 25)

| (51) Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | キーワード(参考) |
|--------------------------------------|------|---------------|-------------|
| A 6 1 K 35/82 | | A 6 1 K 35/82 | 4 C 0 8 3 |
| 7/00 | | 7/00 | K 4 C 0 8 8 |
| | | | M |
| | | | N |
| | | | U |
| 審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 10 頁) 最終頁に続く | | | |

| | | | |
|-----------|-----------------------------|----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願2000-181179(P2000-181179) | (71) 出願人 | 599091391 エム・ディジャパン株式会社 東京都渋谷区代々木2丁目23番1号 |
| (22) 出願日 | 平成12年6月16日(2000. 6. 16) | (72) 発明者 | 中山 泰一 神奈川県横浜市港北区新羽町1050番地 株 式会社資生堂第一リサーチセンター内 |
| | | (72) 発明者 | 勝田 雄治 神奈川県横浜市港北区新羽町1050番地 株 式会社資生堂第一リサーチセンター内 |
| | | (74) 代理人 | 100090527 弁理士 館野 千恵子 |
| | | 最終頁に続く | |

(54) 【発明の名称】 プロテアーゼ阻害剤

(57) 【要約】

【課題】 セリンプロテアーゼ活性およびマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP s) 活性に基づく種々の皮膚疾患や、乾燥や洗浄剤等によって惹起される肌荒れ・荒れ性、および皮膚老化等に対して広く効果を有するプロテアーゼ阻害剤を提供する。

【解決手段】 金糸刷 (*Lethariella cladonioides* (Ny l.) Krog) および松石蕨 (*Cladonia fallax* Abbayes) のような *Lethariella* 属植物および *Cladonia* 属植物よりなる群から選ばれた一種または二種以上の植物またはその抽出物を有効成分として含有させる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 *Lethariella* 属植物および *Cladonia* 属植物よりなる群から選ばれた一種または二種以上の植物またはその抽出物を有効成分として含有することを特徴とするプロテアーゼ阻害剤。

【請求項2】 *Lethariella* 属植物および *Cladonia* 属植物よりなる群から選ばれた一種または二種以上の植物またはその抽出物を有効成分として含有することを特徴とするセリンプロテアーゼ阻害剤。

【請求項3】 *Lethariella* 属植物および *Cladonia* 属植物よりなる群から選ばれた一種または二種以上の植物またはその抽出物を有効成分として含有することを特徴とするプラスミン阻害剤。

【請求項4】 *Lethariella* 属植物および *Cladonia* 属植物よりなる群から選ばれた一種または二種以上の植物またはその抽出物を有効成分として含有することを特徴とするマトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) 阻害剤。

【請求項5】 *Lethariella* 属植物および *Cladonia* 属植物よりなる群から選ばれた一種または二種以上の植物またはその抽出物を有効成分として含有することを特徴とするコラゲナーゼ阻害剤。

【請求項6】 *Lethariella* 属植物および *Cladonia* 属植物よりなる群から選ばれた一種または二種以上の植物またはその抽出物を有効成分として含有することを特徴とするゼラチナーゼ阻害剤。

【請求項7】 *Lethariella* 属植物が金糸刷 (*Lethariella cladonioides* (Nyl.) Krog) または、*Cladonia* 属植物が松石蕊 (*Cladonia fallax* Abbaye s) である請求項1～6のいずれかに記載の剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明はプロテアーゼ阻害剤に関し、さらに詳しくは、患部においてプラスミン (Plasmin) 及び/またはプラスミノゲンアクチベーター (Pmsinogen activator: PA) などのセリンプロテアーゼの活性変化が認められる皮膚疾患、例えば接触性皮膚炎、乾癬、尋常性天疱瘡、先天性水疱瘡等の他、乾燥や洗浄剤等によって惹起される肌荒れ、荒れ性に対して改善・予防効果を有するセリンプロテアーゼ阻害剤またはマトリックスメタロプロテアーゼ (Matrix metalloproteinases、以下MMPs) の活性を阻害するマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤 (以下、MMPs) に関する。本発明のプロテアーゼ阻害剤は、医薬品、医薬部外品、基礎化粧品、メイクアップ化粧品、頭髪用化粧品、浴剤などに好適に使用しうるものである。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】 従来より、肌荒れに対して改善・予防効果を有するものとして種々の治療薬、皮膚外用剤、化粧品等が知られてい

る。これら従来の薬剤や化粧品等における有効成分としては、消炎剤や抗炎症作用を有するとされる動物性の抽出エキス、保湿・保水作用の高いアミノ酸や多糖、脂質、天然高分子等が、皮膚の炎症や皮膚からの水分消失を防止、あるいは皮膚の弾力性を高める能力に優れているために用いられてきた。しかしながらいずれにおいてもその肌荒れ改善・予防効果は必ずしも十分ではなく、より優れた薬剤の開発が期待されていた。

【0003】 一方、近年肌荒れや角化異常を伴う種々の皮膚疾患の発生機序が生化学的に解明されつつある。肌荒れや角化異常を伴う種々の皮膚疾患の病像形成には、プロテアーゼ、特にプラスミンやプラスミノゲンアクチベーター (PA) といったセリンプロテアーゼの活性変化が深く関与していることが指摘されており、例えば炎症性異常角化性疾患の代表である乾癬では、その患部表皮の錯角化部位に強いPA活性が存在すること (Haustein: Arch. Klin. Exp. Dermatol; 234, 1969) や、乾癬鱗屑から高濃度の塩溶液を用いてPAを抽出したという報告 (Fraki, HopsuHavu: Arch. Dermatol. Res; 256, 1976) がなされている。PAはプラスミンの前駆体であるプラスミノゲンに特異的に働いて、それを活性なプラスミンに変換するプロテアーゼである。またセリンプロテアーゼ阻害剤として知られる化合物が、肌荒れを制御したことを示した報告もある (Kenji kitamura: J. Soc. Cosmet. Chem. 29(2), 1995)。

【0004】 また、皮膚の老化に伴う変化、即ち、シミ、くすみ、きめの消失、弾力性の低下等に、従来より紫外線が大きく関与していることが知られている。これらの変化をミクロ的に見れば、コラーゲン、エラスチン等の真皮マトリックス成分の減少、変性、さらには基底膜損傷や表皮肥厚が起こっており、それらの変化が、皮膚の老化につながると考えられている。

【0005】 近年研究が進み、この変化を誘導する因子として、エラスターゼを代表とするセリンプロテアーゼやMMPsの関与が指摘されてきている。MMPsには多くの種類が知られており、構造的、機能的特徴に共通点を有してはいるものの、それぞれの基質蛋白が異なっている (宮崎香, 生化学68巻12号, PP1791-1807 (1996))。マトリックスメタロプロテアーゼの中でも、MMP1は、皮膚真皮マトリックスの主な構成成分であるタイプI, IIIコラーゲンを分解し、セラチナーゼ群に属するMMP2, 9は基底膜成分であるタイプIVコラーゲンやラミニン、真皮マトリックス成分のエラスチン等を分解し、さらにストロムライシン群に属するMMP3, 10はプロテオグリカンやタイプIVコラーゲン、ラミニン等を分解する酵素として知られているが、その発現は紫外線の暴露により大きく増加し、紫外線による細胞外マトリックスの減少変性の原因の一つとなり、皮膚のシワの形成等の大きな要因の一つであると考えられている (Gary J. Fisher et al. Nature, 379(2

5), 335(1996) ; Gary J. Fisher et al. The New England Journal Of Medicine, 337(20), 1419(1997))。このようにMMPs活性の阻害は種々の細胞外マトリックスを保護し、皮膚の老化を防ぐうえで重要である。

【0006】ところが、従来の抗老化薬剤には、線維芽細胞を活性化し、コラーゲンの産生量を増加させる機序を持ったものは多く認められるが、各々のMMPs活性の阻害に着目したものは存在していない。そこで、我々は、抗老化のみならず、肌荒れ防止にも有効な薬剤の開発をめざして、セリンプロテアーゼや種々のMMPsの阻害作用を有するプロテアーゼ阻害剤の開発を行ってきた。

【0007】上述のような現況に鑑み、本発明者らは、種々の皮膚疾患、肌荒れ、荒れ性および皮膚老化の改善・予防には、プラスミンやPA、エラスターゼ等のセリンプロテアーゼあるいはMMPsに対し阻害作用を有する物質が有効であると考え、広く種々の物質について当該作用を調べた結果、Lethariella属植物およびCladonia属植物が特に優れた効果を有することが明らかとなり、これに基づき本発明を完成するに至った。

【0008】

【課題を解決するための手段】すなわち本発明は、Lethariella属植物およびCladonia属植物よりなる群から選ばれた一種または二種以上の植物またはその抽出物を有効成分として含有することを特徴とするプロテアーゼ阻害剤である。また本発明によれば、上記植物またはその抽出物を有効成分として含有することを特徴とするセリンプロテアーゼ阻害剤、および上記植物またはその抽出物を有効成分として含有することを特徴とするマトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)阻害剤が提供される。

【0009】本発明において、セリンプロテアーゼ阻害剤の応用としては、プラスミン阻害剤やエラスターゼ阻害剤としての適用が可能である。また、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)阻害剤の応用としては、コラゲナーゼ阻害剤およびゼラチナーゼ阻害剤としての適用が可能である。

【0010】本発明に用いられるLethariella属植物およびCladonia属植物はいずれもある種の菌類と藻類とから成立っている共生体である地衣植物の一種であるが、地衣植物成分が美肌効果を有することはすでに報告されている(特公平5-21085号公報)。しかしながら、地衣植物の中でも特にLethariella属植物およびCladonia属植物がセリンプロテアーゼ阻害作用およびマトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)阻害作用を有していることは今までに知られておらず、本発明者が初めて見出したものである。このセリンプロテアーゼ阻害作用およびマトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)阻害作用は前記

したようにしわの改善や若返りの助長等、いわゆる皮膚老化防止、美肌だけではなく、セリンプロテアーゼ活性あるいはMMPs活性に基づく皮膚疾患や肌荒れ等に対しても効果を有するものである。

【0011】本発明に用いられるLethariella属植物はサルオガセ科に属するものである。さらに、Lethariella属植物の中でも、金糸刷(Lethariella cladonioides(Nyl.)Krog)には、とりわけ優れた効果が認められる。

【0012】本発明に用いられるCladonia属(ハナゴケ属)植物よりなる群から選ばれた一種または二種以上の植物はハナゴケ科に属するものである。さらに、Cladonia属植物の中でも、松石蕊(Cladonia fallax Abbayes)には、とりわけ優れた効果が認められる。

【0013】金糸刷(Lethariella cladonioides(Nyl.)Krog)は、四川省、甘肅省、雲南省、陝西省の高山の枯木に生息する植物で、金刷把という生薬の原植物である。この生薬は、消炎、止痛、鎮静、頭目眩暈等に効くとされている(中薬辞海、中国医薬科技出版社発行、第2巻、p909, 1996)。

【0014】金糸刷については、中薬辞海(中国医薬科技出版社発行、第2巻、p909, 1996)には以下の旨の記載がなされている。「本種は陝西中草薬(陝西省革命委員会衛生局・商業局編、科学出版社、p626, 1971)》においてCladonia fallax Abbayesと誤って称され、その後、《中薬大辞典(江新医学院編、上海科学技術出版社、p1395, 1977)》、《全国中草薬編(全国中草薬編写組編、人民衛生出版社、下冊、第二版、p392, 1996)》および《中国薬用孢子植物(丁恒山編、上海科学技術出版社、p191, 1982)》においても常にCladonia fallax Abbayesと引用されてきた。今後この学名は訂正されなければならない。」このことから、Cladonia fallax Abbayes(松石蕊)と、Lethariella cladonioides(Nyl.)Krog(金糸刷)とは同等物であるとみなす考え方もある。

【0015】Lethariella属植物またはCladonia属植物は、生のままでも乾燥したものでも使用することができるが、使用性、製剤化等の点から乾燥粉末あるいは溶媒抽出物として用いることが好ましい。

【0016】上記植物の抽出物は常法により得ることができ、例えば、各植物を抽出溶媒と共に浸漬または加熱還流した後、濾過し濃縮して得ることができる。抽出溶媒としては、通常抽出に用いられる溶媒であれば任意に用いることができ、例えば、メタノール、エタノール等のアルコール類、含水アルコール、アセトン、酢酸エチルエステル、1,3-ブチレングリコール等の有機溶媒を、それぞれ単独あるいは組み合わせて用いることがで

きる。また、抽出物を上記の溶媒を用い、分配あるいはクロマトグラフィーのごとき精製等の処理を加えて得られたものを用いることもできる。このようにして得た上記植物抽出物は、安全性が高く、優れたセリンプロテアーゼ阻害作用およびマトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)阻害作用を有する。

【0017】なお、本発明に関わるセリンプロテアーゼ阻害作用とは、プラスミン、組織型プラスミノゲンアクチベーター、ウロキナーゼ、トリプシン、エラスターゼ等に対して拮抗作用を有し、それらの活性発現を直接あるいは間接的に阻害する作用を意味する。

【0018】また、本発明の植物またはその抽出物は、タイプI、IIIコラーゲンを分解するMMP1およびタイプIVコラーゲンを分解するMMP3およびMMP9の活性を阻害し、かつゼラチナーゼを分解するMMP9の活性を阻害する。本発明に関わるMMPs阻害作用とは、上記MMPsに対して拮抗作用を有し、それらの活性発現を直接あるいは間接的に阻害する作用を意味する。よって、本発明のマトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)阻害剤は、コラーゲナーゼ阻害剤およびゼラチナーゼ阻害剤としての応用が可能であり、さらにその適用として、エラスチン分解抑制剤、ラミニン分解抑制剤、基底膜分解抑制剤およびコラーゲン分解抑制剤や、さらにプロテオグリカン分解抑制剤としての適用が可能である。

【0019】本発明のプロテアーゼ阻害剤は、セリンプロテアーゼあるいはマトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)活性に基づく肌荒れ改善組成物、老化防止用組成物あるいは皮膚疾患用組成物として用いることを好適とし、その場合の植物またはその抽出物の配合量は、外用剤全量中、乾燥物として0.00001~10.0重量%、好ましくは0.0001~5.0重量%である。0.00001重量%未満であると、本発明でいう効果が十分に発揮されず、10.0重量%を越えると製剤化が難しいので好ましくない。また、5.0重量%以上配合してもさほど大きな効果の向上はみられない。

【0020】本発明のプロテアーゼ阻害剤を含有する皮膚外用剤には、上記植物またはその抽出物に加えて、本発明の効果を損なわない範囲内で、通常化粧品や医薬品等の皮膚外用剤に用いられる成分、例えば、保湿剤、酸化防止剤、油性成分、紫外線吸収剤、乳化剤、界面活性剤、増粘剤、アルコール類、粉末成分、色材、水性成分、水、各種皮膚栄養剤等を必要に応じて適宜配合することができる。

【0021】さらに、エデト酸二ナトリウム、エデト酸三ナトリウム、クエン酸ナトリウム、ポリリン酸ナトリウム、メタリン酸ナトリウム、グルコン酸、リンゴ酸等の金属封鎖剤、カフェイン、タンニン、ペラパミル、トラネキサム酸およびその誘導体、甘草抽出物、グラブリ

ジン、カリンの果実の熱水抽出物、各種生薬、トコフェロール、グリチルリチン酸およびその誘導体またはその塩等の薬剤、ビタミンC、アスコルビン酸リン酸マグネシウム、アスコルビン酸グルコシド、アルブチン、コウジ酸等の美白剤、フルクトース、マンノース、エリスリトール、トレハロース、キシリトール等の糖類なども適宜配合することができる。

【0022】また、本発明を皮膚外用剤に用いる場合、外皮に適用される化粧品、医薬品、医薬部外品、特に好適には化粧品に広く適用することが可能であり、その剤型も、皮膚に適用できるものであればいずれでもよく、溶液系、可溶化系、乳化系、粉末分散系、水-油二層系、水-油-粉末三層系、軟膏、ゲル、エアゾール等、任意の剤型が適用される。また、その使用形態も任意であり、例えば化粧水、クリーム、乳液、ローション、パック、軟膏、ムース、石鹸等の他、ファンデーションや口紅等のメーキャップ化粧品、浴用剤等、従来皮膚外用剤に用いるものであればいずれでもよく、剤型は特に問わない。

【0023】

【実施例】次に、実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明の技術範囲はこれら実施例により何ら限定されるものではない。なお、配合量はすべて重量%である。実施例に先立ち、本発明に用いられる植物抽出物のセリンプロテアーゼ阻害作用、MMPs阻害作用および実使用試験(肌荒れ改善)に関する試験方法及びその評価基準について説明する。

【0024】1. セリンプロテアーゼ阻害作用試験およびその結果

(1) 試料の調製

金糸刷(Lethariella cladonioides(Nyl.)Krog) 50g(湿重量)を室温で1週間、5倍量のエタノールに浸漬し、得られた抽出液を濃縮乾固し、乾固物を得た。この固形物をジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解し、3%、0.3%、0.03%及び0.003%溶液を調製した。これらを用いてセリンプロテアーゼとして知られるプラスミン、エラスターゼ及びトリプシンに対する阻害作用を、以下の方法で評価した。

【0025】(2) プラスミン阻害作用の測定

フィブリン平板法にて阻害率(%)を求めた。すなわち1.0%のプラスミノゲン除去フィブリンノーゲンを含むペロナール緩衝液(0.125mol/L-NaOHを含む25mmol/L-バルビタル酸ナトリウム水溶液、pH7.4)6mLを9cmφシャーレに注ぎ、そこに1.0mol/L-CaCl₂を0.2mLと25U/mLのトロンビン0.1mLを加えて静かに混和し、1時間放置した。フィブリンノーゲンがフィブリンに変化することによって形成された平板上に、5U/mLのプラスミンと試料溶液を29:1の割合で混合した混合物を、37℃で10分間保温した後20μL添加し、

さらに37℃で18時間放置した。対照として試料溶液の代わりにDMSOを用いて同様の操作を行い、その後、フィブリンが溶解して形成された溶解円の面積を測定し、下記の式(1)によりプラスミン阻害率を求めた。結果を表1に示す。また、比較品として高いプラス

ミン阻害作用を有すると知られているザクロ (*Punica granatum*) の果実のエタノール抽出物についても同様の試験を行った。

【0026】

$$\text{阻害率 (\%)} = \{1 - (\text{被験試料の溶解円面積} / \text{対照の溶解円面積})\} \times 100$$

… (1)

【0027】 (3) エラスターゼ阻害作用の測定
エラスターゼ活性測定はFujieらの方法に従って、以下の通り行った。また、反応緩衝液として、0.1 M HEPES、0.5 M NaCl (pH 7.4) を用いて行った。エラスターゼ基質として、Methoxy-succinyl-alanyl-alanyl-prolyl-valine-p-nitroanilide (BACHEMFEINCHEMIKALIEN AG) を、80 mMになるようにDMSOに溶解し、20 μl づつ分注して冷凍保存 (-80℃) した。使用時には、反応緩衝液で、8 mMになるように希釈して使用した。エラスターゼはヒト白血球由来のエラスターゼ (ELASTIN PRODUCT CO., INC.) を使用し、200 μg/ml になるように反応緩衝液に溶解し、10 μl づつ分注して冷凍保存 (-80℃) し

た。使用時には、反応緩衝液で5 μg/ml になるように希釈して使用した。96穴プレート (CORNING 25860) に、それぞれ、8 mMのエラスターゼ基質を25 μl づつ分注し、さらに50 μl の阻害剤を添加した。次に、氷上で5 μg/ml のエラスターゼを25 μl 加えて、直ちに37℃で20分間インキュベーションした。その後、415 nmで吸光度を測定した。ただし、阻害率は以下の式(2)による。結果を表1に示す。また、比較品としてエラスターゼ阻害活性のあることが知られているダイズ抽出物 (商品名エルヒビン; ペンタファーム社製) についても同様の試験を行った。

【0028】

$$\text{阻害率 (\%)} = \{1 - (\text{阻害物質存在下} / \text{阻害物なし})\} \times 100 \quad \dots (2)$$

【0029】 (4) トリプシン阻害作用の測定
カゼインを基質として阻害率を求めた。すなわち、2 mLのリン酸緩衝液にトリプシン20 μgを溶かし、これに6.0%のカゼインを含む0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 7.4) を0.9 mLと、試料溶液0.1 mLを加えて37℃で10分間保温した。その後、5%のトリクロ酢酸3 mLを添加して室温に1時間放置し、3,500 rpmで15分間遠心した後、その上澄みの280 nmの吸光度を測定した。なお、以上の操作をTest

に変えたものをControl (C)、被験試料の代わりにDMSOを添加したものをStandard (S)、Standardのトリプシン添加の順序をトリクロ酢酸の後に変えたものをBlank (B) とし、下記の式(3)によりトリプシン阻害率を求めた。結果を表1に示す。また、比較品としてザクロ (*Punica granatum*) の果実のエタノール抽出物についても上記と同様の試験を行った。

【0030】

$$\text{阻害率 (\%)} = \{1 - (T - C) / (S - B)\} \times 100 \quad \dots (3)$$

【表1】

【0031】

| | 試料最終濃度 (%) | 阻害率 (%) | | |
|----------|---------------|---------|--------|-------|
| | | プラスミン | エラスターゼ | トリプシン |
| 金糸刷抽出物 | 0.1 | 76.8 | 95.2 | 71.8 |
| | 0.01 | 17.1 | 78.7 | 31.9 |
| | 0.001 | 12.5 | 40.8 | 9.7 |
| | 0.0001 | 9.7 | 21.3 | — |
| ザクロ果実抽出物 | 0.1 | 28.0 | — | 12.9 |
| | 0.01 | 10.9 | — | 4.9 |
| ダイズ抽出物 | 0.1 | — | 76.5 | — |
| | 0.01 | — | 24.6 | — |

【0032】表1から明らかなように、本発明の植物抽出物は、比較品のザクロ抽出物、ダイズ抽出物に比べ、

高いセリンプロテアーゼ (プラスミン、エラスターゼ、トリプシン) 阻害作用を有することがわかる。

【0033】2. MMP s 阻害作用試験およびその結果

(1) 試料の調製

金糸刷 (Lethariella cladonioides (Nyl.) Krog) 50 g (湿重量) を10倍量の精製水に浸漬、加温抽出した。得られた抽出液を濃縮乾固し、乾固物を得た。この固形分を用いてMMP s に対する阻害作用を以下の方法で評価した。

【0034】測定にはヤガイ製のIV型コラゲナーゼ、I型コラゲナーゼ、ストロメリシン-1測定キットを用いた。金糸刷抽出物をジメチルスルホキシドに溶解して2重量%溶液とし、測定用緩衝液 (0.4M NaCl, 10mM CaCl₂を含むpH7.4の0.1Mトリス) で所定濃度に希釈した (重量%で表示)。用いた酵素はヤガイ製のヒト細胞由来のMMP 1、MMP 3、MMP 9である。被験物質を含んでいない反応系での基質分解率に対する被験物質を含んだ系での基質分解率の割合より、被験物質の活性阻害率を測定した。その結果を表2に示す。また参考例として、MMP s 阻害作用がよく知られている物質であるエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) についても、上記と同様の試験を行った。その結果を併せて表2に記す。

【0035】

【表2】

| 試料 | 濃度 (%) | 酵素 | 阻害率 (%) |
|--------|--------|-------|---------|
| 金糸刷抽出物 | 0.05 | MMP 9 | 70 |
| 金糸刷抽出物 | 0.005 | MMP 9 | 40 |
| EDTA | 0.05 | MMP 9 | 90 |
| EDTA | 0.005 | MMP 9 | 0 |
| 金糸刷抽出物 | 0.01 | MMP 1 | 78 |
| 金糸刷抽出物 | 0.001 | MMP 1 | 30 |
| EDTA | 0.05 | MMP 1 | 89 |
| EDTA | 0.005 | MMP 1 | 0 |
| 金糸刷抽出物 | 0.005 | MMP 3 | 95 |
| 金糸刷抽出物 | 0.0005 | MMP 3 | 10 |

| | | | |
|------|-------|-------|---|
| EDTA | 0.05 | MMP 3 | 2 |
| EDTA | 0.005 | MMP 3 | 0 |

【0036】表2より明らかなように、金糸刷抽出物のMMP 9、MMP 1およびMMP 3阻害効果は、優れたMMP s 阻害効果が知られているEDTAのMMP 9、MMP 1およびMMP 3阻害効果と同等以上であった。

【0037】3. 実使用試験

(1) 肌荒れ改善効果試験

試料として、金糸刷 (Lethariella cladonioides (Nyl.) Krog) の50 g (湿重量) を室温で1週間、5倍量の50% 1, 3-ブチレングリコールに浸漬し、ろ過して得た抽出液を含む表3に示すような本発明のローションと、すでに肌荒れに対する改善効果を有することが知られているムラサキイリス (Iris germanica L.) の根 (特開昭62-61924号公報他) の50%エタノール抽出物を配合した比較用ローションを用いて、人体パネルで肌荒れに対する改善効果を評価した。

【0038】即ち、女性健康人の肌 (顔面頬部) のレプリカをレプリカ剤を用いて採取し、皮膚表面形態を顕微鏡 (17倍) にて観察した。皮紋の状態及び角層の剥離状態から以下に示す判定基準に基づいて肌荒れ評点1もしくは2と判定された30名を肌荒れパネルとし、10名ずつ3群に分け、1群ごとに各試料ローションを割り付けた。顔面に1日2回、4週間試料ローションを塗布させ、4週間後、再び上述のレプリカ法にしたがって肌の状態を観察し、判定基準にしたがって評価した。その結果を表4に示す。

【0039】<レプリカ判定基準>

- 1: 皮溝、皮丘の消失、広範囲の角層のめくれが認められる。
 2: 皮溝、皮丘が不鮮明、角層のめくれが認められる。
 3: 皮溝、皮丘は認められるが、平坦。
 4: 皮溝、皮丘が鮮明。
 5: 皮溝、皮丘が鮮明で整っている。

【0040】

【表3】

| 試料 | 本発明品 | 比較品 1 | 比較品 2 |
|------------------|------|-------|-------|
| 金糸刷抽出物 | 0.5 | — | — |
| ムラサキイリス抽出物 | — | 0.5 | — |
| グリセリン | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| 1, 3-ブチレングリコール | 4.0 | 4.0 | 4.0 |
| エタノール | 7.0 | 7.0 | 7.0 |
| ポリオキシエチレン (20モル) | | | |
| オレイルアルコール | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| 精製水 | 残余 | 残余 | 残余 |

【0041】

【表4】

| レプリカ評価 | 本発明品 | 比較品1 | 比較品2 |
|--------|------|------|------|
| 1 | 0名 | 0名 | 1名 |
| 2 | 2 | 4 | 5 |
| 3 | 3 | 3 | 4 |
| 4 | 3 | 2 | 0 |
| 5 | 2 | 1 | 0 |

【0042】表4から分かるように、本発明のローションは比較品のローションと比較し、優れた肌荒れ改善効果が認められた。

【0043】実施例1 クリーム

| (処方) | 重量% |
|-------------------|------|
| ステアリン酸 | 5.0 |
| ステアリルアルコール | 4.0 |
| イソプロピルミリステート | 18.0 |
| グリセリンモノステアリン酸エステル | 3.0 |
| プロピレングリコール | 10.0 |
| 金糸刷エタノール抽出物 | 0.05 |
| 苛性カリ | 0.2 |
| 亜硫酸水素ナトリウム | 0.01 |
| 防腐剤 | 適量 |
| 香料 | 適量 |
| イオン交換水 | 残余 |

(製法) イオン交換水にプロピレングリコールと金糸刷エタノール抽出物と苛性カリを加え溶解し、加熱して70℃に保つ(水相)。他の成分を混合し加熱融解して70℃に保つ(油相)。水相に油相を徐々に加え、全部加え終わってからしばらくその温度に保ち反応を起こさせる。その後、ホモキサーで均一に乳化し、よくかきまぜながら30℃まで冷却する。

【0044】

実施例2 クリーム

| (処方) | 重量% |
|-------------------|------|
| ステアリン酸 | 2.0 |
| ステアリルアルコール | 7.0 |
| 水添ラノリン | 2.0 |
| スクワラン | 5.0 |
| 2-オクチルドデシルアルコール | 6.0 |
| ポリオキシエチレン(25モル) | |
| セチルアルコールエーテル | 3.0 |
| グリセリンモノステアリン酸エステル | 2.0 |
| プロピレングリコール | 5.0 |
| 松石炭メタノール抽出物 | 0.05 |
| トラネキサム酸 | 0.2 |
| 亜硫酸水素ナトリウム | 0.03 |
| エチルパラベン | 0.3 |
| 香料 | 適量 |
| イオン交換水 | 残余 |

(製法) イオン交換水にプロピレングリコールを加え、加熱して70℃に保つ(水相)。他の成分を混合し加熱融解して70℃に保つ(油相)。水相に油相を加え予備乳化を行い、ホモキサーで均一に乳化した後、よくかきまぜながら30℃まで冷却する。

【0045】

実施例3 クリーム

| (処方) | 重量% |
|----------------------|------|
| 固形パラフィン | 5.0 |
| ミツロウ | 10.0 |
| ワセリン | 15.0 |
| 流動パラフィン | 41.0 |
| グリセリンモノステアリン酸エステル | 2.0 |
| ポリオキシエチレン(20モル) | |
| ソルビタンモノラウリル酸エステル | 2.0 |
| 石けん粉末 | 0.1 |
| 硼砂 | 0.2 |
| 金糸刷1, 3-ブチレングリコール抽出物 | 0.1 |
| 亜硫酸水素ナトリウム | 0.03 |
| エチルパラベン | 0.3 |
| 香料 | 適量 |
| イオン交換水 | 残余 |

(製法) イオン交換水に石けん粉末と硼砂を加え、加熱

して70℃に保つ（水相）。他の成分を混合し加熱融解して70℃に保つ（油相）。水相に油相をかきまぜながら徐々に加え反応を行なう。その後、ホモキサーで均

一に乳化し、よくかきまぜながら30℃まで冷却する。
【0046】

実施例4 乳液

| (処方) | 重量% |
|--|------|
| ステアリン酸 | 2.5 |
| セチルアルコール | 1.5 |
| ワセリン | 5.0 |
| 流動パラフィン | 10.0 |
| ポリオキシエチレン (10モル) | |
| モノオレイン酸エステル | 2.0 |
| ポリエチレングリコール1500 | 3.0 |
| トリエタノールアミン | 1.0 |
| カルボキシビニルポリマー | 0.05 |
| (商品名: カーボポール941, B.F. Goodrich Chemical company) | |
| 金糸刷酢酸エチル抽出物 | 0.02 |
| 亜硫酸水素ナトリウム | 0.01 |
| エチルパラベン | 0.3 |
| 香料 | 適量 |
| イオン交換水 | 残余 |

(製法) 少量のイオン交換水にカルボキシビニルポリマーを溶解する (A相)。残りのイオン交換水にポリエチレングリコール1500とトリエタノールアミンを加え、加熱溶解した70℃に保つ (水相)。他の成分を混合し加熱融解して70℃に保つ (油相)。水相に油相を加え予備乳化を行い、A相を加えホモキサーで均一に乳化し、乳化後よくかきまぜながら30℃まで冷却する。

【0047】

実施例5 乳液

| (処方) | 重量% |
|-------------------|------|
| マイクロクリスタリンワックス | 1.0 |
| ミツロウ | 2.0 |
| ラノリン | 20.0 |
| 流動パラフィン | 10.0 |
| スクワラン | 5.0 |
| ソルビタンセスキオレイン酸エステル | 4.0 |
| ポリオキシエチレン (20モル) | |
| ソルビタンモノオレイン酸エステル | 1.0 |
| プロピレングリコール | 7.0 |
| 金糸刷30%ブタノール抽出物 | 2.0 |
| トラネキサム酸 | 1.0 |
| 亜硫酸水素ナトリウム | 0.01 |
| エチルパラベン | 0.3 |
| 香料 | 適量 |
| イオン交換水 | 残余 |

(製法) イオン交換水にプロピレングリコールを加え、

実施例6 ゼリー

| (処方) | 重量% |
|-------------|------|
| 95%エチルアルコール | 10.0 |

| | |
|--|-------|
| ジプロピレングリコール | 15.0 |
| ポリオキシエチレン (50モル) | |
| オレイルアルコールエーテル | 2.0 |
| カルボキシビニルポリマー | 0.05 |
| (商品名: カーボボール940, B.F. Goodrich Chemical company) | |
| 苛性ソーダ | 0.15 |
| L-アルギニン | 0.1 |
| 金糸刷50%エタノール抽出物 | 0.001 |
| 亜硫酸水素ナトリウム | 0.01 |
| エチルパラベン | 0.3 |
| 香料 | 適量 |
| イオン交換水 | 残余 |

(製法) イオン交換水にカーボボール940を均一に溶解し、一方、95%エタノールに金糸刷抽出物、ポリオキシエチレン (50モル) オレイルアルコールエーテルを溶解し、水相に添加する。次いで、その他の成分を加えた後苛性ソーダ、L-アルギニンで中和させ増粘する。

【0049】

実施例7 バック

| (処方) | 重量% |
|-------------------|------|
| (A相) | |
| ジプロピレングリコール | 5.0 |
| ポリオキシエチレン (60モル) | |
| 硬化ヒマシ油 | 5.0 |
| (B相) | |
| オリーブ油 | 5.0 |
| 酢酸トコフェロール | 0.2 |
| エチルパラベン | 0.2 |
| 香料 | 0.2 |
| (C相) | |
| 亜硫酸水素ナトリウム | 0.03 |
| ポリビニルアルコール | 13.0 |
| (けん化度90、重合度2,000) | |
| エチルアルコール | 7.0 |
| 金糸刷乾燥粉末 | 1.0 |

(製法) A相、B相をそれぞれ均一に溶解し、A相にB相を加えて可溶化する。次いで金糸刷乾燥粉末を分散させたC相をこれに加えた後充填を行う。

【0050】

【発明の効果】以上説明したように、本発明によれば、セリンプロテアーゼ活性およびマトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) 活性に基づく種々の皮膚疾患や、乾燥や洗剤等によって惹起される肌荒れ・荒れ性、および皮膚老化等に対して広く効果を有するプロテアーゼ阻害剤を提供することができる。

フロントページの続き

| (51) Int. Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | テーマコード (参考) |
|----------------------------|-------|---------------|-------------|
| A 6 1 K 7/48 | | A 6 1 K 7/48 | |
| A 6 1 P 17/00 | | A 6 1 P 17/00 | |
| 17/16 | | 17/16 | |
| 43/00 | 1 1 1 | 43/00 | 1 1 1 |

| | | | |
|---------|-----------------------|----------|-------------------------------|
| (72)発明者 | 吉田 雄三 | Fターム(参考) | 4C083 AA082 AA111 AA112 AB032 |
| | 神奈川県横浜市港北区新羽町1050番地 株 | | AB352 AC012 AC022 AC072 |
| | 式会社資生堂第一リサーチセンター内 | | AC092 AC102 AC122 AC182 |
| (72)発明者 | 猪股 慎二 | | AC242 AC352 AC422 AC442 |
| | 神奈川県横浜市港北区新羽町1050番地 株 | | AC482 AC522 AC582 AD042 |
| | 式会社資生堂第一リサーチセンター内 | | AD092 AD512 AD662 BB51 |
| | | | CC02 CC05 CC07 DD31 DD41 |
| | | | EE12 EE13 |
| | | 4C088 | AA17 AC01 CA02 CA05 CA06 |
| | | | CA07 CA08 CA11 CA14 MA63 |
| | | | NA14 ZA89 ZB13 ZC20 |